Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 1, Apr. May. 2018, p. 93- 106

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 1، فروردین-اردیبهشت 1397 ص.106-93

به‌کارگیری *لاکتوباسیلوس‌روتری* در تهیه نان پروبیوتیک بخش 2: ارزیابی فرآیند ریزپوشانی دولایه *لاکتوباسیلوس روتری* به روش بسترشناور بر مقاومت حرارتی

لیلا زاغری[1]- علیرضا بصیری[2*]- سمیه رحیمی[2]- علی زنوزی[3]

تاریخ دریافت: 1395/03/29
تاریخ پذیرش: 1396/02/11

چکیده

در این تحقیق از کیتوزان، کلریدکلسیم و صمغ عربی به‌ترتیب در غلظت‌های (0/5، 1 و 1/5 درصد)، (5 درصد) و (1/5، 3 و 6 درصد) (وزنی/ حجمی) برای ریزپوشانی لایه‌دوم گرانول‌های حاوی *لاکتوباسیلوس روتری*، استفاده شد. زنده‌مانی نسبی باکتری‌های ریزپوشانی شده با کیتوزان و صمغ عربی در غلظت‌های به‌ترتیب 1 و 6 درصد (وزنی/ حجمی) پس از آزمون حرارتی (دمای 80 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه)، به‌ترتیب (7/31 و 3/7 درصد) و پس از آزمون حرارتی (دمای 80 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه)، به‌ترتیب (0/63 و 0/31 درصد) بود که افزایش معنی‌داری نسبت به دیگر نمونه‌ها و شاهد نشان داد. تاثیر زمان پوشش‌دهی (45 و90 دقیقه) بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از آزمون حرارتی، نشان داد که نمونه‌های پوشش‌دهی شده با محلول کلریدکلسیم با غلظت 5% (وزنی/ حجمی) به مدت 90 دقیقه، پس از آزمون حرارتی (دمای 80 درجه سانتی‌گراد و زمان 15 دقیقه)، 9% بود که به‌طور معنی‌داری، دارای زنده‌مانی بالاتری نسبت به سایر نمونه‌ها می‌باشند. با افزایش زمان پوشش‌دهی، قطر میکروکپسول‌ها افزایش و میزان انتقال حرارت به قسمت مرکز هسته کاهش یافته و زنده‌مانی باکتری افزایش می‌یابد. میزان زنده‌مانی باکتری در نمونه ریزپوشانی شده با کلریدکلسیم 5 درصد (وزنی/ حجمی)، 1 و 24 ساعت پس از پخت در نان به‌ترتیب (0/56 و 0/52 درصد) بود که نسبت به نمونه ریزپوشانی شده با کیتوزان 1 درصد به‌طور معنی‌داری به‌ترتیب (0/47 و0/44) افزایش نشان داد. تعداد باکتری‌های زنده در هر دو پوشش 1 و 24 ساعت پس از پخت، بیش از 10^6 (CFU/g) بود.

واژه‌های کلیدی: *لاکتوباسیلوس‌روتری*، ریزپوشانی دولایه، پوشش‌دهنده بسترشناور، مقاومت حرارتی، نان پروبیوتیک

مقدمه

نان در بسیاری از جوامع جهانی به دلیل ارزش غذایی و قیمت مناسب، نقش مهمی را در رژیم غذایی، برعهده دارد. افزایش سطح آگاهی مصرف‌کننده‌ها نسبت به نقش فرآورده‌های پروبیوتیک در ارتقا سلامت، منجر به گسترش روند بکارگیری باکتری‌های پروبیوتیک در طیف وسیعی از مواد غذایی شده است. با توجه به گستردگی مصرف نان، امکان افزودن باکتری‌های پروبیوتیک به آن، می‌تواند نقش مهمی در ارتقای سلامت جامعه داشته باشد. باکتری‌های پروبیوتیک برای ایجاد اثرات سلامت‌بخش خود، باید به صورت زنده و فعال به تعداد کافی به روده انتقال یابند. افزایش مقاومت در برابر حرارت‌های اعمال شده در هنگام تولید نان، استرس‌های ناشی از فشار اسمزی و مکانیکی در طول دوره نگهداری و همچنین اثرات شرایط اسیدی معده، از چالش‌های اصلی در تولید نان پروبیوتیک به‌شمار می‌آیند (Cook *et al.*, 2011; Rosell, 2007) فناوری ریزپوشانی به‌منظور افزایش مقاومت باکتری‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی، کنترل انتشار و حفظ ساختار باکتری‌ها در حین عبور از معده و قبل از انحلال در روده استفاده می‌شود (Burgain *et al.*, 2011). به‌کارگیری دماهای بیش از 45 درجه سانتی‌گراد در هنگام پخت نان، باعث تخریب باکتری‌های پروبیوتیک آزاد می‌گردد. از این رو بسیاری از تولیدکنندگان نان ترجیح می‌دهند، باکتری‌های پروبیوتیک را پس از فرآیند حرارتی به محصول اضافه کنند که منجر به نگرانی‌هایی در ارتباط با بحث ایمنی موادغذایی می‌گردد. تحقیقاتی در خصوص افزودن پروبیوتیک‌ها بر روی سطح نان صورت گرفته است. در بخش

1- دانش‌آموخته، کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران.
2- استادیار، گروه صنایع غذایی و تبدیلی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران.
3- استادیار، گروه صنایع غذایی و تبدیلی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران.
4- استادیار، گروه مهندسی زراعی، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران.
(* - نویسنده مسئول: (Email: bassiri@irost.ir
DOI: 10.22067/ifstrj.v1396i0.56866

اول مقاله، اثرات ریزپوشانی هسته- پوسته بـا اسـتفاده از دو پوشـش آلژینات سدیم و شلاک، بر زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس‌روتری* در شرایط شبیه‌سازی شده معده (pH =2) به روش بسترشـناور، بررسـی شد. منحنی رشد بدست‌آمده نشان داد که باکتری‌ها 16 تا 18 ساعت پس از تلقیح وارد فاز ثابت رشد شده و آماده جداسازی توده سلولی از محیط کشت، می‌باشند. بررسی اثرات دمای هـوای ورودی و نسـبت باکتری به قندها در فرمولاسیون، نشـان داد کـه زنـده‌مـانی نسـبی باکتری (٪) در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و در نسـبت برابـر قنـد و باکتری (10-10) به‌طور معنی‌داری ($P\leq0/05$) افزایش نشان می‌دهد. زنده‌مانی نسبی باکتری‌های جذب شده در ماتریس هسته، قبل و پس از پوشش‌دهی در دستگاه پوشش‌دهنده بستر شناور بـا محلـول‌هـای شلاک در سه غلظت 16، 17 و 18 درصد (وزنی/ حجمی) و آلژینـات سدیم در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد (وزنی/ حجمـی)، کـاهش معنی‌داری ($P\leq0/05$)، نشـان نـداد. زنـده‌مـانی نسـبی بـاکتری (٪) پوشش‌دهی شده با محلول آلژینات سدیم با غلظت 1 درصد (وزنـی/ حجمی) پس از طی دوره زمانی 1 ساعت در شرایط شبیه‌سازی شـده معده با pH=2، به‌طور معنی‌داری ($P\leq0/05$) نسبت به پوشش‌هـای دیگر افزایش نشان داد (زاغری و همکاران، 1396). فورتول و ترازاس (2012)، باکتری‌های *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* را در محلولی شامل ایزوله پروتئین آب‌پنیر، کربوکسـی متیـل سـلولز، پکتـین و اینـولین به‌وسیله خشک‌کن پاششی، ریزپوشانی و در مخلوطی با نشاسـته بـه سطح نان نیمه‌پخته، افزودند. علت استفاده از نان‌های نیمه‌پخته، مدت زمان کمتری است که برای پخت کامل نیاز دارند. در ایـن تحقیـق، باکتری‌های پروبیوتیک پس از پخت و 24 سـاعت پـس از آن زنـده باقی ماندند. سوکولیس و همکاران (2014)، *لاکتوباسیلوس‌رامنوسوس* را به فیلمی از آلژینات سدیم 1 درصد و کنسانتره پروتئین آب پنیر 2 درصد، اضافه و فیلم را به سطح خمیر نان نیمه‌پخته افزودند و سپس در دو مرحله (دمای60 درجه سانتی گراد، به مدت10 دقیقه) و (دمای 180 درجه سانتی‌گراد، به مدت 2 دقیقه)، سطح نان را خشک کردند. وجود کنسانتره پروتئین آب‌پنیر و پوشش آلژینات سـدیم، منجـر بـه افزایش معنی‌داری در تعداد باکتری‌های زنده پـس از پخـت، تحمـل شرایط شبیه‌سازی شده معده و نگهداری، در مقایسه با نمونـه شـاهد (بدون پوشـش) گردیـد. راهکارهـای ارایـه شـده جهـت تولیـد نـان پروبیوتیک شامل به‌کارگیری گونه‌هایی از باکتری‌های پروبیوتیک که به‌صورت طبیعی و یا به دلیل دستکاری ژنتیکی، مقاوم بـه دماهـای بالا، می‌باشند و یا ریزپوشانی با ترکیباتی که قادر به افزایش مقاومت حرارتی باکتری‌ها باشند، می‌گردند (Anal& Singh., 2007). اکبک و هاکانسون (2012) ، دو گونه جدید مقاوم به حرارت بـاکتری‌هـای *لاکتوباسـیلوس*، بـه نـام‌هـای *لاکتوباسـیلوس* پلانتـاروم (LB3e) و *لاکتوباسـیلوس‌پلانتـاروم* (LB7c) شناسـایی و بـا غلظـت 1×10^6 (CFU/g) به خمیر نان اضافه کردند. تعداد باکتری‌های زنده پـس از پخت در دمای 220 درجه سانتی‌گراد و زمان 20 دقیقـه، بـه میـزان 2×10^3 (CFU/g) کاهش یافت. ایمن‌بودن و میزان اثرات پروبیوتیکی باکتری‌های بکـاربرده شـده، هنـوز تاییـد نشـده اسـت. گنجـوری و همکاران (1391)، *باسیلوس‌کواگولانس* را به‌عنوان پروبیوتیک مقـاوم به حرارت، برای غنی‌سازی نان‌های حجیم استفاده‌کردند که طـی آن تعداد *باکتری‌ها* از 10^8 به 10^6 در هر گرم، پس از پخت نان کـاهش یافت. ریزپوشانی تک‌لایه قادر به ایجاد مقاومت لازم در باکتری‌های پروبیوتیک در برابـر شـرایط حرارتـی و اسـیدی نمـی‌باشـد Desai &park, 2005). ریزپوشانی چندلایه بـه روش بسترشـناور، روشـی نوین در پوشش‌دهی باکتری‌های پروبیوتیک، به‌شمار می‌آید که طـی آن، چندین لایه از ترکیبات پوششی، پیرامون هسته اولیه، بـا هـدف کاهش نفوذ حـرارت بـه مرکـز هسـته و افـزایش مقاومـت در برابـر pHهـای پـایین، تشـکیل مـی‌شـوند (Zorea &penhasi, 2012). بـورگین و همکـاران (2011) از پوشـش دولایـه بـرای ریزپوشـانی باکتری‌های پروبیوتیک استفاده کردند که لایه اول شامل پپتید سویا و لایه دوم شامل سلولز و صمغ بود و نشان دادند که کاربرد پوشش‌دهی دولایه منجر به افزایش زنده‌مانی باکتری در عبور از محـیط اسـیدی معده و رهایش کنترل شده آن در روده می‌شود (Burgain, *et al*., 2011).

در ایـن تحقیـق اثـرات ریزپوشـانی بـا ترکیبـات کیتـوزان در غلظت‌های 0/5، 1و 1/5 درصـد (وزنـی/ حجمـی)، صـمغ عربـی در غلظت‌های 1/5، 3 و 6 درصد (وزنـی/ حجمـی) و کلریدکلسـیم 5% (وزنـی/ حجمـی)، بـه‌عنـوان لایـه دوم، بـر زنـده‌مـانی بـاکتری *لاکتوباسیلوس روتری* پس از اعمال فرآیند حرارتی (دمای 80 درجـه سانتی‌گراد در زمان‌های 15 و 30 دقیقه) و همچنین اثر پوشش‌دهی با کیتوزان 1% و کلریدکلسیم 5% بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪)، 1 و 24 ساعت پس از پخت نان (دمای 180 درجـه سـانتی‌گـراد و زمـان 20 دقیقه)، با هدف دستیابی به فن‌آوری تولید نان پروبیوتیک، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مـواد مـورد اسـتفاده در ایـن تحقیـق شـامل مالتودکسـترین و سوربیتول (DE=3) (تهیه محلول قند)، آلژینات سدیم (پوشـش لایـه اول)، کیتوزان (پوشش لایه دوم)، پپسین و بافرفسـفات (pH = 7/2) (شبیه‌سازی شرایط محیط اسیدی معده) از شـرکت سـیگما- آلـدریچ (آلمان)، کلریدکلسیم (پوشش لایـه دوم)، کلریدسـدیم (شـبیه‌سـازی شرایط محیط اسیدی معده)، اسید کلریـدریک (شـبیه‌سـازی شـرایط محیط اسیدی معده)، صمغ عربـی (پوشـش لایـه دوم) و پـودر شـیر پس‌چرخ (تهیه پودر باکتری) از شرکت مرک (آلمان)، شلاک (پوشش لایه اول) از شرکت آکواگلد (آلمان)، میکروکریستالین‌سلولز (Avicel ph-20) (حامل خنثی و جاذب باکتری)، از شرکت اف‌ام‌سی بیـوپلیمر

(بلژیک)، محیط کشت MRS آگار و براث از شرکت تیتان بیوتک (هندوستان)، سرم رینگر و محلول کلرید سدیم از شرکت داروسازی ثامن (ایران) و باکتری *لاکتوباسیلوس روتری* (PTCC -1655) به‌صورت کشت زنده، از مرکز منطقه‌ای میکروارگانیسم‌های صنعتی (ایران) تهیه شدند.

شمارش سلول‌های زنده

شمارش سلول‌های زنده در سوسپانسیون اولیه (CFU/ml) به روش کشت سطحی سنجیده شد. 0/5 میلی‌لیتر از محلول پروبیوتیک قند و باکتری برداشته و 10 بار نمونه در سرم فیزیولوژی 0/9 درصد کلریدسدیم به حجم 4/5 میلی‌لیتر رقیق شد. مقدار100 میکرولیتر از سریال رقت‌های 7 تا 10 برداشته و روی سطح پلیت حاوی محیط کشت MRS آگار در سه تکرار کشت و به مدت 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری شد. نمونه‌هایی حاوی 20 تا 350 کلونی (CFU/ml) شمارش شد (Semyonove *et al*.,2014).

سنجش مقاومت حرارتی

باکتری‌های آزاد و ریزپوشانی‌شده، در آون (Wiseven، آلمان) و در دمای 80 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 و 30 دقیقه قرار گرفتند. پس از پایان آزمون حرارتی، 0/5گرم از پودر در دمای محیط در درون هاون و در شرایط استریل، کاملا خرد شده و در فالکون حاوی 4/5 میلی‌لیتر بافر فسفات مخلوط و پس از 10 دقیقه استراحت، به مدت 90 دقیقه در شیکر با سرعت 450 دور در دقیقه قرار داده شده و سپس از طریق آزمون کشت سطحی، غلظت باکتری‌های زنده، سنجیده و زنده‌مانی نسبی باکتری‌ها (٪) نسبت به محلول پروبیوتیک اولیه محاسبه شد (Lima *et al*., 2009).

تهیه محلول‌های ترکیبات پوشش‌دهنده

در بخش اول این تحقیق از فن‌آوری بستر شناور (پوشش‌دهنده مدل ورستر با پاشش تحتانی)، به‌منظور تولید میکروکپسول‌های پوسته و هسته، حاوی *لاکتوباسیلوس روتری* استفاده شد. محلول حاوی *لاکتوباسیلوس روتری* و قندهای سوربیتول و مالتودکسترین با نسبت برابر قند و باکتری (10 -10)، بر روی حامل خنثی (میکروکریستالین سلولز)، به منظور تولید گرانول‌های غیر آگلومره، با سرعت جریان محلول ورودی 0/25 میلی‌لیتر بر دقیقه و فشار هوای خروجی پمپ 300 میلی‌بار در دمای 37 درجه سانتی‌گراد پاشیده و جذب شد. باکتری‌های جذب‌شده بر روی پودر MCC با محلول شلاک در سه غلظت 16، 17 و 18 درصد (وزنی/ حجمی) و آلژینات سدیم در غلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد (وزنی/حجمی) پوشش‌دهی شدند. زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پوشش‌دهی شده با محلول آلژینات سدیم با غلظت 1 درصد (وزنی/ حجمی) بعد از طی دوره زمانی 1 ساعت در شرایط شبیه‌سازی شده معده با pH=2، به‌طور معنی‌داری نسبت به پوشش‌های دیگر افزایش نشان داد و به‌عنوان پوشش مناسب برای لایه اول انتخاب شد (زاغری و همکاران، 1396). سپس باکتری‌های ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم 1 درصد در لایه اول با صمغ عربی، کیتوزان و کلریدکلسیم در لایه دوم پوشش‌دهی شدند.

پودر کیتوزان درغلظت‌های 0/5، 1 و 1/5 درصد توزین و در10 میلی‌لیتر اسید استیک 1 درصد حل شده و با سود 0/1 نرمال pH آن بر روی 5 تنظیم و با آب‌مقطر به حجم20 میلی‌لیتر رسانده شد. محلول‌های آبی صمغ عربی و کلریدکلسیم در غلظت‌های تحت بررسی به‌ترتیب (1/5، 3 و 6 درصد) و (5 درصد) تهیه شدند. محلول‌های بدست‌آمده در اتوکلاو و در دمای 121 درجه سانتی‌گراد به مدت 15دقیقه استریل شدند (Michael *et al*.,2010). محلول‌های پوششی در غلظت‌های تحت بررسی با فشار هوای خروجی پمپ 300 میلی‌بار با سرعت 0/25 میلی‌لیتر بر دقیقه بر روی گرانول‌های مرحله قبل (پس از جذب محلول باکتری و ریزپوشانی لایه اول) که با فشار هوای شناورسازی 100 میلی‌بار و دمای 37 درجه سانتی‌گراد شناور شده‌اند، در سه تکرار پاشش شد. آزمون تعیین غلظت باکتری‌های زنده، پس از ریزپوشانی و آزمون‌های حرارتی انجام شد.

بررسی زنده‌مانی نسبی باکتری‌ها

زنده‌مانی نسبی باکتری‌ها (٪) پس از آزمون حرارتی (دمای 80 درجه سانتی‌گراد در دو زمان 15 و 30 دقیقه) در نمونه‌های ریزپوشانی‌شده با کیتوزان با غلظت بهینه 1 درصد و صمغ عربی با غلظت بهینه 6 درصد و محلول کلرید کلسیم 5 درصد در دو زمان پوشش‌دهی 45 و 90 دقیقه، بررسی و با هم مقایسه شدند. سپس نمونه‌های ریزپوشانی شده با کیتوزان 1 درصد و کلریدکلسیم 5 درصد به خمیر نان افزوده و آزمون پخت در دمای 180 درجه سانتی‌گراد و زمان 20 دقیقه، انجام شد و اثر ریزپوشانی با کیتوزان 1 درصد و کلرید کلسیم 5 درصد بر غلظت باکتری‌های زنده در نان، 1 و 24 ساعت پس از پخت بررسی شد.

سنجش دمای مرکز نان در طول فرآیند پخت

نوک پروب ترمومتر سوزنی (TM-914، آلمان) در مرکز چانه قبل از فرگذاری قرارگرفته و تغییرات دمای خمیر در طول فرآیند پخت (دمای 180 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه) در سه تکرار ثبت شد.

پخت نان و سنجش زنده‌مانی نسبی باکتری‌ها در نان

مواد اولیه شامل آرد گندم، نمک طعام، مخمر نانوایی، بهبوددهنده، شکر با یکدیگر مخلوط و پس از افزودن آب، در همزن

(B.Sad، ایران) با سرعت60 دور در دقیقه به مدت 3 دقیقه مخلوط شدند، تخمیر اولیه در رطوبت نسبی 80 درصد و دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه انجام شد. خمیر بدست آمده به چانه‌های50 گرمی تقسیم شده و به هر یک 2 گرم از نمونه‌های ریزپوشانی شده اضافه و تخمیر نهایی به مدت 40 دقیقه در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی80 درصد صورت‌گرفت. پخت نان در دمای 180 درجه سانتی‌گراد، به مدت 20 دقیقه و رطوبت نسبی 60-70 درصد انجام شد. (Lima *et al*, 2009; Zorea &penhasi., 2012). پس از پخت نان، آزمون کشت سطحی و شمارش کلونی‌های باکتری صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل یافته‌های تحقیق، به روش تجزیه واریانس یکطرفه (One way ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش21) و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن، انجام گرفت.

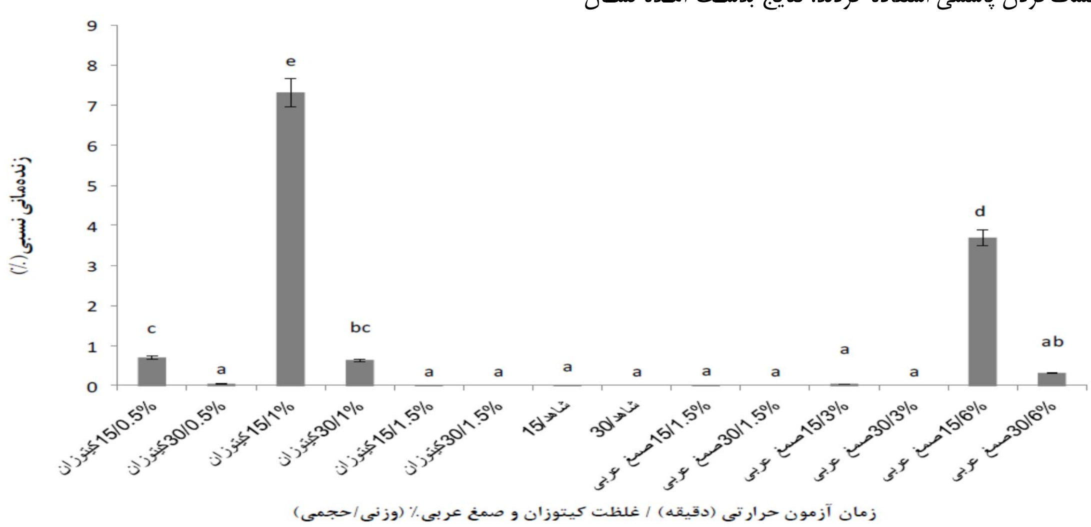
نتایج و بحث

بررسی شرایط ریزپوشانی و شرایط حرارتی فرآوری نان بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪)

بررسی اثر غلظت کیتوزان و صمغ عربی بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از آزمون حرارتی

در شکل1، زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در نمونه‌های ریزپوشانی شده دولایه با آلژینات سدیم 1 درصد و کیتوزان و صمغ عربی در غلظت‌های تحت بررسی پس از آزمون حرارتی با هم مقایسه شده است. زنده‌مانی نسبی باکتری در نمونه ریزپوشانی شده با کیتوزان 1 درصد (وزنی/ حجمی) در دمای80 درجه سانتی‌گراد و زمان 15 دقیقه، 7/31 درصد بود که به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر نمونه‌ها افزایش نشان می‌دهد. زنده‌مانی نسبی باکتری در نمونه‌های ریزپوشانی شده با محلول کیتوزان 0/5 درصد در زمان 30 دقیقه، 0/05 درصد و غلظت 1/5 درصد در زمان 15 دقیقه، 0/003 درصد و زمان 30 دقیقه، صفر درصد بود که در هر دو زمان 15 و 30 دقیقه در مقایسه با نمونه شاهد پس از آزمون حرارتی، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج بدست آمده نشان دادند که زنده‌مانی نسبی باکتری‌های ریزپوشانی شده با کیتوزان 0/5 درصد، پس از آزمون حرارتی 15 دقیقه، 0/7 درصد و پس از آزمون حرارتی 30 دقیقه، 0/05 درصد بود که نسبت به نمونه شاهد در هر دو زمان 15 و 30 دقیقه، افزایش نشان می‌دهد که این افزایش در زمان 15 دقیقه، معنی‌دار می‌باشد. با افزایش غلظت محلول پوششی تا 1 درصد این افزایش به سطح معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد در هر دو زمان آزمون حرارتی، رسیده است. با افزایش بیشتر غلظت تا 1/5 درصد، زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در مقایسه با نمونه شاهد، افزایش مشاهده نشد. افزایش غلظت در سطح 1/5 درصد باعث شد که محلول غلیظ در برخورد با جریان هوای خروجی پمپ نتواند به ذرات ریز تبدیل شده و اتمایزه‌شدن محلول به درستی صورت نگیرد و باعث گرفتگی نازل شود. زوریا و پنهاسی (2012)، *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌بیفیدوم* را به روش بستر شناور، با سه‌لایه، به ترتیب روغن جامد هیدروژنه، آلژینات سدیم 2 درصد (وزنی/ وزنی) و محلول کیتوزان 4 درصد (وزنی/ وزنی) ریزپوشانی نمودند. میزان زنده‌مانی نسبی (٪) باکتری‌های ریزپوشانی شده پس از آزمون حرارتی در دمای 80 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 و 45 دقیقه، کاهش معنی‌داری مشاهده نشد در حالی که در نمونه شاهد (بدون پوشش) کاهش معنی‌داری نشان داد. در تحقیق حاضر با افزایش زمان حرارت‌دهی از 15 به 30 دقیقه، کاهش معنی‌داری در زنده‌مانی نسبی باکتری ریزپوشانی شده با کیتوزان 1 درصد (وزنی/ حجمی) مشاهده شد که با نتایج آنان، همخوانی ندارد. دلیل احتمالی عدم همخوانی، افزودن لایه روغنی بر روی هسته میکروکپسول می‌تواند باشد که به‌عنوان عایق حرارتی عمل کرده و محافظت بیشتری از باکتری در برابر حرارت فراهم می‌کند. کی و همکاران (2011)، *لاکتوباسیلوس‌برویس* را با آلژینات سدیم 2 درصد (وزنی/ حجمی)، کلریدکلسیم 3 درصد (وزنی/ حجمی) و کیتوزان 2 درصد (وزنی/ حجمی) به روش امولسیون، ریزپوشانی و میزان زنده‌مانی باکتری را پس از آزمون حرارتی در دمای 85 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 دقیقه بررسی و نشان دادند که میزان زنده‌مانی نسبی باکتری پس از اعمال حرارت، 10 برابر کاهش می‌یابد. فارز و همکاران (2015)، *لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم* را با آلژینات سدیم 1 درصد (وزنی/ حجمی)، زانتان 1 درصد (وزنی/ حجمی)، کلرید کلسیم 0/1 مولار و کیتوزان 0/2 درصد (وزنی/ حجمی) به روش اکستروژن و خشک کردن انجمادی ریزپوشانی‌کردند و میزان زنده‌مانی باکتری ریزپوشانی شده را در دمای 75 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، 90 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 ثانیه و 62/5 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه، بررسی‌کردند. نتایج بررسی نشان داد که ساختار ریزپوشانی شده با صمغ زانتان، آلژینات سدیم و کیتوزان به علت تشکیل ماتریس سنگین‌تر و قطر بیشتر، می‌تواند محافظت بیشتری از باکتری در برابر اعمال دماهای بالا ایجاد کند. در تحقیق حاضر نیز، با افزایش غلظت محلول پوششی کیتوزان از 0/5 به 1 درصد (وزنی/ حجمی)، میکروکپسول با ساختار سنگین‌تر و قطر بیشتر بدست آمد که موجب افزایش زنده‌مانی باکتری از 4 تا 33 درصد پس از تحمل دمای 80 درجه سانتی‌گراد به مدت زمان 15 دقیقه شد. طالب‌زاده و همکاران (2014)، *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* را با آلژینات سدیم 3 درصد (وزنی/ حجمی)، کلرید کلسیم 0/1 مولار و کیتوزان 0/4 درصد (وزنی/ حجمی) با روش امولسیون پوشش‌دهی کردند و میزان

زنده‌مانی باکتری ریزپوشانی‌شده را پس از آزمون حرارتی در دمای70 درجه سانتی‌گراد به مدت 25 دقیقه بررسی‌کردند. تعداد باکتری‌های زنده در نمونه‌های ریزپوشانی‌شده با آلژینات سدیم، (آلژینات سدیم و کیتوزان) و نمونه شاهد به‌ترتیب 2/46، 2/1 و 4/89 سیکل لگاریتمی کاهش یافت. نتایج بررسی نشان داد میزان زنده‌مانی باکتری با افزودن کیتوزان به ترکیب پوشش، افزایش می‌یابد که با نتایج تحقیق حاضر، مطابقت دارد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که زنده‌مانی نسبی باکتری‌ها (٪) در نمونه ریزپوشانی‌شده با صمغ عربی 6 درصد (وزنی/ حجمی) در دمای 80 درجه سانتی‌گراد و زمان 15 دقیقه، 3/7 درصد بود که به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت‌های دیگر از صمغ عربی افزایش نشان داد. زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در نمونه‌های ریزپوشانی شده با محلول صمغ عربی 1/5 درصد در زمان 15 دقیقه، 0/004 درصد و در زمان 30 دقیقه صفر درصد و محلول صمغ عربی 3 درصد (وزنی/ حجمی) در دو زمان 15 و 30 دقیقه، به‌ترتیب (0/041 و صفر درصد) بود که در مقایسه با نمونه شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج بررسی نشان داد که زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از آزمون حرارتی با افزایش غلظت محلول پوششی صمغ عربی، نسبت به نمونه بدون پوشش در هر دو زمان (15 و30 دقیقه)، افزایش یافته و این افزایش در نمونه ریزپوشانی شده با صمغ عربی 6 درصد به سطح معنی‌داری می‌رسد. در نمونه ریزپوشانی شده با صمغ عربی 6 درصد، با افزایش زمان از 15 به 30 دقیقه،زنده‌مانی نسبی (٪) به‌ترتیب (3/7 و 0/31 درصد) بود که کاهش معنی‌داری در زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) مشاهده می‌شود. دسموند و همکاران (2002)، از صمغ عربی برای ریزپوشانی *لاکتوباسیلوس کازئی*، به روش خشک‌کردن پاششی استفاده کردند. نتایج بدست آمده نشان دادند که ریزپوشانی با صمغ عربی در دماهای بکاررفته (100- 105 درجه سانتی‌گراد)، باعث افزایش غلظت باکتری‌های زنده به میزان 10 برابر، نسبت به نمونه شاهد می‌گردد. هم‌چنین غلظت باکتری‌های زنده ریزپوشانی‌شده در شرایط شبیه‌سازی‌شده معده و شرایط نگهداری در دماهای 4، 15 و 30 درجه سانتی‌گراد، به‌ترتیب، 100 برابر و 1000 برابر بیشتر از نمونه شاهد بود. موسیلی (2003)، اثرات دما و زمان فرآیند حرارتی بر زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با صمغ عربی، (صمغ عربی و پروتئین آب پنیر) و (صمغ عربی و پروتئین سویا) را بررسی و نشان دادند که پوشش صمغ عربی به تنهایی نمی‌تواند محافظت کافی را در برابر اعمال دماهای بالا ایجاد کند به‌گونه‌ای که پوشش پروتئین آب‌پنیر و صمغ عربی کارایی بیشتری در محافظت باکتری در برابر فرآیند حرارتی نسبت به دو ترکیب دیگر، نشان داد که دناتوره‌شدن پروتئین آب پنیر در دماهای بالا می‌تواند علت این پدیده باشد. بهزادی و همکاران (2013)، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* را با صمغ عربی و مالتودکسترین به روش بستر شناور ریزپوشانی و تاثیر دمای 60 درجه سانتی‌گراد در زمان‌های (60 ، 90، 120، 240، 360 و 600 ثانیه) را بر زنده‌مانی باکتری بررسی و نشان دادند که ریزپوشانی باکتری با ترکیب صمغ عربی و مالتودکسترین در مقایسه با ریزپوشانی با مالتودکسترین به تنهایی، کارایی بالاتری در محافظت از باکتری در برابر تنش حرارتی دارد. در تحقیق حاضر نیز از مالتودکسترین (در مرکز هسته) و پوشش صمغ عربی 6 درصد (وزنی/ حجمی) استفاده شد که میزان زنده‌مانی نسبی (٪) در نمونه ریزپوشانی شده پس از آزمون حرارتی 80 درجه سانتی‌گراد در زمان 15 دقیقه، 3/7 درصد بود.



شکل 1: بررسی ریزپوشانی با کیتوزان و صمغ عربی در غلظت‌های تحت بررسی بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از آزمون حرارتی

(اعداد نمودار بیانگر میانگین سه تکرار آزمایش هستند و حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 در می‌باشد)

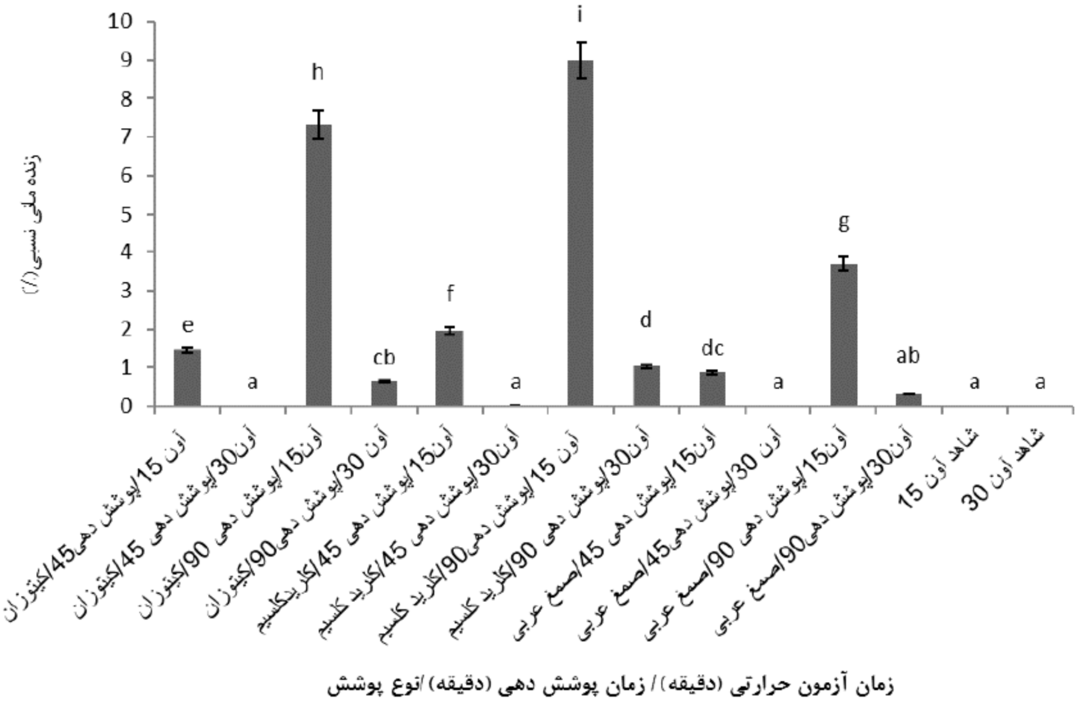
بررسی اثر زمان ریزپوشانی با کیتوزان 1 درصد، صمغ عربی 6 درصد و کلریدکلسیم 5 درصد بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از آزمون حرارتی

زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در ریزپوشانی با کلریدکلسیم 5 درصد به مدت 90 دقیقه پس از آزمون حرارتی (دمای80 درجه سانتی‌گراد و زمان 15 دقیقه)، 9 درصد بود که به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌های دیگر افزایش نشان داد. زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در همه نمونه‌های ریزپوشانی شده دولایه به مدت زمان 45 دقیقه، در آزمون حرارتی (دمای 80 درجه سانتی‌گراد و زمان 30 دقیقه) در مقایسه با نمونه شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج بررسی نشان داد که با افزایش زمان پوشش‌دهی از 45 به 90 دقیقه، زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از آزمون حرارتی، افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند. افزایش زمان آزمون حرارتی از 15 به 30 دقیقه، کاهش معنی‌داری در زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) ایجاد می‌کند. بر این اساس، با افزایش زمان پوشش‌دهی، قطر میکروکپسول‌ها افزایش، میزان انتقال حرارت به قسمت مرکز هسته کاهش و زنده‌مانی باکتری افزایش می‌یابد. سابیخی و همکاران (2010)، میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم 4 درصد (وزنی/ حجمی)، 2 درصد نشاسته ذرت، محلول کلرید کلسیم 0/1 مولار و 1 درصد استئاریک اسید به روش امولسیون را پس از فرآیند حرارتی در دماهای 72، 85 و90 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه بررسی و نشان دادند که زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی شده در تمامی دماهای تحت بررسی نسبت به شاهد، افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. پوئم و همکاران (2015)، *بیفیدوباکتریوم لانگوم* را با آلژینات سدیم 2 درصد (وزنی/حجمی)، کلریدکلسیم 0/1 مولار و فروکتوالیگوساکارید 1 درصد به دو روش اکستروژن و امولسیون ریزپوشانی و زنده‌مانی باکتری‌ها را پس از آزمون حرارتی در دمای 65 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 و 30 دقیقه بررسی‌کردند. زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی‌شده به روش اکستروژن در مقایسه با روش امولسیون پس از آزمون حرارتی در دو زمان بررسی‌شده، افزایش معنی‌داری نشان داد. بکارگیری روش اکستروژن در ریزپوشانی باعث افزایش قطر میکروکپسول‌ها و به دنبال آن، افزایش زنده‌مانی باکتری می‌شود که با نتایج بدست‌آمده در این تحقیق همخوانی دارد. ماندل و همکاران (2006)، *لاکتوباسیلوس کازئی* را با آلژینات سدیم در غلظت‌های 2، 3 و 4 درصد (وزنی/ حجمی) و محلول کلریدکلسیم 0/1 مولار به روش امولسیون ریزپوشانی و زنده‌مانی باکتری را پس از آزمون حرارتی در دماهای 55، 60 و 65 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه بررسی‌کردند. نتایج بررسی نشان‌داد که با افزایش غلظت آلژینات سدیم در پوشش، زنده‌مانی باکتری افزایش می‌یابد. در تحقیق حاضر بیشترین میزان زنده‌مانی 9 درصد بود که در نمونه‌های ریزپوشانی شده با آلژینات سدیم 1 درصد (وزنی/ حجمی) و محلول کلریدکلسیم 5 درصد (وزنی/ حجمی) با ترکیب‌های پری‌بیوتیک مالتودکسترین و سوربیتول در مرکز هسته پس از قرارگیری در دمای 80 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه، بدست آمد. نتایج تحقیق طالب‌زاده و همکاران (2014)، نشان‌دادند که زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در نمونه‌های ریزپوشانی‌شده با آلژینات سدیم، (آلژینات سدیم و کیتوزان) و نمونه شاهد پس از آزمون حرارتی در دمای70 درجه سانتی‌گراد به مدت 25 دقیقه به‌ترتیب 2/46 ، 2/1 و 4/89 سیکل لگاریتمی، کاهش می‌یابد و نتیجه گرفتند که میزان زنده‌مانی باکتری با افزودن کیتوزان به ترکیب پوشش و افزایش قطر میکروکپسول، افزایش می‌یابد. فارز و همکاران (2015)، در ریزپوشانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم نشان دادند* که با افزایش زمان پوشش‌دهی از 45 به 90 دقیقه، زنده‌مانی باکتری‌های پس از اعمال فرآیند حرارتی، افزایش می‌یابد. در تحقیق حاضر نیز با افزایش زمان پوشش‌دهی، قطر میکروکپسول افزایش و میزان انتقال حرارت به قسمت مرکز هسته کاهش و زنده‌مانی باکتری افزایش یافت.

بررسی اثر دما و زمان آزمون حرارتی بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) ریزپوشانی‌شده با صمغ عربی 6 درصد، کیتوزان 1 درصد و کلرید کلسیم 5 درصد

زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در میکروکپسول‌های دولایه با آلژینات سدیم 1 درصد در لایه اول و صمغ عربی، کیتوزان و کلریدکلسیم در لایه دوم پس از آزمون حرارتی بررسی د (شکل 3). زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در ریزپوشانی با کلریدکلسیم 5 درصد (وزنی/ حجمی) در دمای80 درجه سانتی‌گراد و زمان 15 دقیقه به‌طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌های دیگر افزایش نشان داد. زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در نمونه پوشش‌دهی شده دو لایه با محلول کلریدکلسیم 5 درصد در هر دو زمان آزمون حرارتی (15 و30 دقیقه) به‌ترتیب (9 و 1/5 درصد) بود که در مقایسه با نمونه‌های دیگر افزایش معنی‌داری نشان داد. زنده‌مانی نسبی باکتری (٪)، تنها در نمونه ریزپوشانی‌شده با صمغ عربی6 درصد پس از آزمون حرارتی (زمان 30 دقیقه)، 0/002 درصد بود که در مقایسه با سایر نمونه‌ها افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد نشان نداد. با افزایش زمان آزمون حرارتی از 15 به 30 دقیقه، در تمامی ترکیبات به‌کاررفته در ریزپوشانی، کاهش معنی‌داری در زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) مشاهده شد. چاندرامولی و همکاران (2004)، از آلژینات‌کلسیم برای ریزپوشانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* استفاده کردند. در این تحقیق اثر کپسول‌هایی با ابعاد 200، 450 و 1000 میکرومتر و غلظت‌های 0/75، 1، 1/5، 1/8 و 2 % (وزنی/ حجمی) از آلژینات و غلظت‌های متفاوتی از کلریدکلسیم 0/1، 0/2 و 1 مولار، در میزان زنده‌مانی

باکتری‌های ریزپوشانی شده، در شرایط شبیه‌سازی‌شده معده، بررسی گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش قطر کپسول و غلظت آلژینات سدیم، میزان زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی شده افـزایش می‌یابد ولی با افزایش غلظت کلریـدکلسـیم، تفـاوت معنـی‌داری در افزایش زنده‌مانی باکتری ریزپوشانی شده، مشاهده نمی‌شود. در ایـن تحقیق نیز کلریدکلسیم در یک غلظت به‌کار برده شد. میزان زنده‌مانی باکتری در فرآیند ریزپوشانی، پس از اعمال فرآیند حرارتی و هم‌چنین طـی دوره زمـانی در شـرایط شـبیه‌سـازی‌شـده معـده، بـه گونـه میکروارگانیسم، ترکیبات پری‌بیوتیک و هم‌چنین ترکیبات بکاررفته در ریزپوشانی، وابسته اسـت (Kearney *et al*.,2009). درایـن تحقیـق پوشش آلژینات سدیم 1 درصد (وزنی/ حجمی) به‌عنوان پوشش لایه اول به‌کار رفت. آلژینات سدیم توانـایی تشـکیل سـریع ژل پیرامـون باکتری را دارد، عـلاوه بـر آن، ترکیبـی اسـت ارزان و غیـر سـمی و سهولت آماده‌سازی و آزادسـازی آن در روده و قابلیـت هضـم آسـان توسط میکروارگانیسم‌ها در روده باعث شده که بـه‌طـور گسـترده در فرآیند ریزپوشانی باکتری‌ها به‌کار رود.

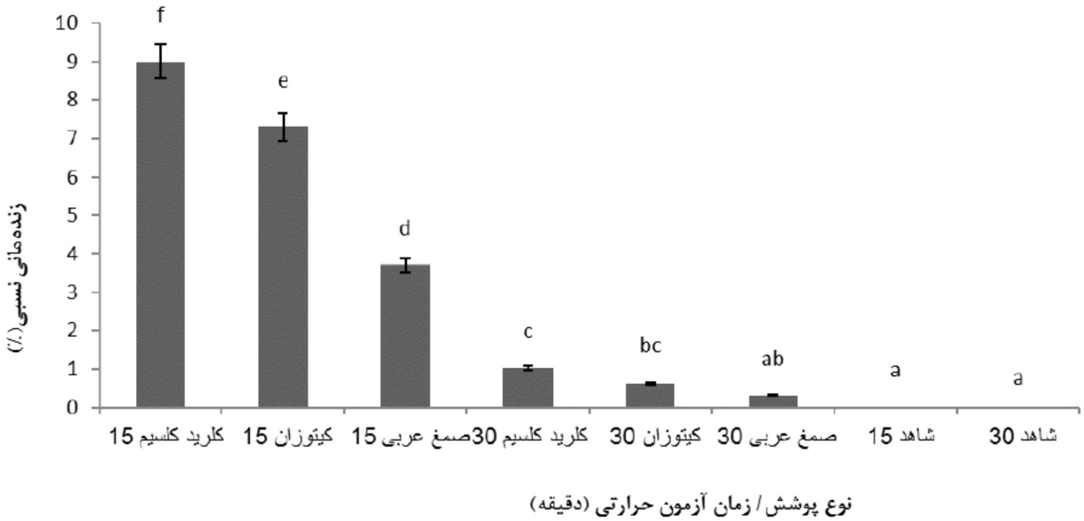


شکل 2- مقایسه اثر زمان ریزپوشانی با کیتوزان 1 درصد (وزنی/ حجمی) و صمغ عربی 6 درصد (وزنی/ حجمی) و کلریدکلسیم 5 درصد (وزنی/ حجمی) بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از آزمون حرارتی

(اعداد نمودار بیانگر میانگین سه تکرار آزمایش هستند و حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 می‌باشد)

از طرف دیگر آلژینات سدیم به محیط اسیدی حساس بـوده و در لاکتیک‌اسید پایداری خود را از دست می‌دهد. پوشش آلژینات سـدیم موجب ایجاد شکستگی و تخلخل در سطح کپسول می‌شـود کـه بـه انتشار سریع رطوبت و مایعات از طریـق کپسـول کمـک مـی‌کنـد و خاصیت محافظت‌کنندگی کپسول در برابر عوامل خـارجی را کـاهش می‌دهد. به همین منظور در تحقیقات صورت گرفته از آلژینات سدیم همراه با پلیمرهای دیگر همانند نشاسته در پوشش کپسـول اسـتفاده شده است. آلژینات سدیم همـراه بـا کیتـوزان تشـکیل شـبکه‌ای بـا ویژگی‌های محافظت بالا در برابر شرایط نامطلوب محیطی را می‌دهد (Solanki *et al*.,2013). در این تحقیق باکتری‌ها در کپسـول‌هـای دولایه با پوشش آلژینات سدیم 1 درصد در لایه اول و پوشـش‌هـای صمغ عربی، کیتوزان و کلریدکلسیم در لایه دوم ریزپوشـانی شـدند. میزان زنده‌مانی در پودر پوشش‌دهی شده با محلول کلریدکلسـیم بـا غلظت 5 درصد (وزنی/ حجمی) در دمای 80 درجه سانتی‌گراد و زمان 15 دقیقه، 9 درصد و با پوشش کیتوزان و صمغ عربی به‌ترتیب 7/31 و 3/7 درصد بود. صمغ کیتوزان توانایی بالایی در تشکیل فیلم دارد. کاربرد کیتوزان در پوشش منجر به بهبود زنده‌مانی بـاکتری در برابـر اعمال دماهای بالا و شرایط اسیدی می‌گـردد. در هنگـام بکـارگیری پوشش کیتوزان به‌منظور ریزپوشانی بایستی خاصیت ضـدمیکروبی و اثر منفی آن بر زنده‌مانی باکتری‌ها در نظر گرفته شود (Chavarri *et al*.,2010;Capela,2006 ;Zhou,1988). خاصـیت ضـدمیکروبـی کیتـوزان مـی‌توانـد کـاهش 1/69 درصـدی در میـزان زنـده‌مـانی

باکتری‌های ریزپوشانی شده با محلول کیتوزان را در مقایسه با پوشش کلریدکلسیم توجیه کند.

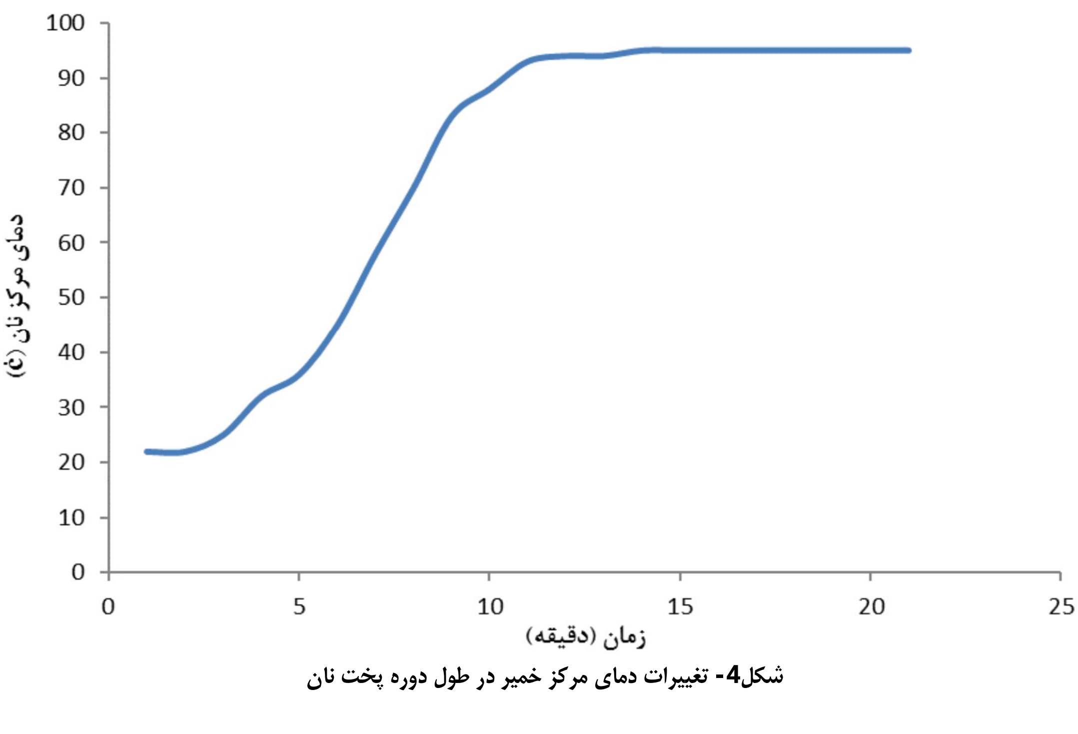


شکل3- بررسی اثر ریزپوشانی دولایه آلژینات سدیم 1 درصد و صمغ عربی 6 درصد و کیتوزان 1 درصد و کلرید کلسیم 5 درصد بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از آزمون حرارتی

(اعداد نمودار بیانگر میانگین سه تکرار آزمایش هستند و حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 می‌باشد)

منحنی دمای پخت در مرکز نان

هدف از انجام این آزمایش تعیین تغییرات دما در مرکز نان در طول دوره پخت بود. دما در مرکز نان از دقیقه هشتم تا بیستم (12 دقیقه) بیش از 80 درجه سانتی‌گراد بود و از دقیقه سیزدهم تا بیستم (7 دقیقه) در دمای 95 درجه سانتی‌گراد ثابت ماند (شکل 4).



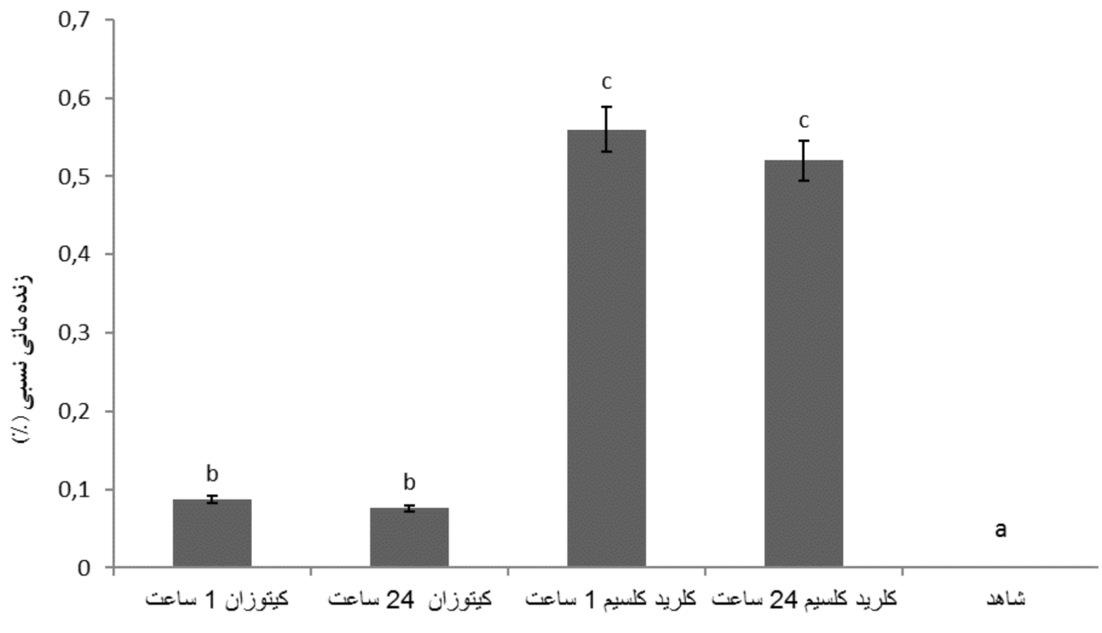
شکل4- تغییرات دمای مرکز خمیر در طول دوره پخت نان

بررسی تاثیر شرایط نگهداری نان بر زنده‌مانی باکتری‌ها

همان‌طور که در شکل 3 نشان داده شد، زنده‌مانی نسبی باکتری (٪)، در پودر پوشش‌دهی شده با صمغ عربی 6 درصد پس از آزمون حرارتی (زمان 30 دقیقه)، در مقایسه با سایر پوشش‌ها افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد نشان نداد. به همین علت میکروکپسول‌ها با پوشش لایه دوم کیتوزان 1 درصد و کلرید کلسیم 5 درصد برای افزودن به خمیر نان استفاده شد.

بررسی اثرات ریزپوشانی با کیتوزان 1 درصد و کلریدکلسیم 5 درصد بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪)، 1 و 24 ساعت پس از پخت نان

زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) در نمونه‌های ریزپوشانی شده با کلریدکلسیم 5 درصد (وزنی/ حجمی) به طور معنی‌داری، 1 و 24 ساعت پس از پخت نان به‌ترتیب (0/56 و 0/52 درصد) بود که به‌طور معنی داری نسبت به نمونه‌های ریزپوشانی شده با کیتوزان، افزایش نشان داد (شکل 5). زنده‌مانی نسبی باکتری‌ها (٪) در نمونه‌های ریزپوشانی شده، 1 و 24 ساعت پس از پخت نان، نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. اختلاف معنی‌داری در زنده‌مانی نسبی (٪) نمونه‌های ریزپوشانی شده، 1 و 24 ساعت پس از پخت، مشاهده نشد. زوریا و پنهاسی (2012)، *لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم‌بیفیدوم* ریزپوشانی شده به‌صورت سه لایه متشکل از روغن جامد هیدروژنه (لایه اول)، آلژینات سدیم 2 درصد (وزنی/ حجمی) (لایه دوم) و کلریدکلسیم 5 درصد (وزنی/ حجمی) (لایه سوم)، را تحت آزمون پخت نان (دمای 200 درجه سانتی‌گراد به مدت زمان 10 دقیقه) قرار دادند و میزان زنده‌مانی نسبی باکتری (50 تا 80 درصد) با شمارش اولیه، 10^9 (CFU/ml) را بدست آوردند.

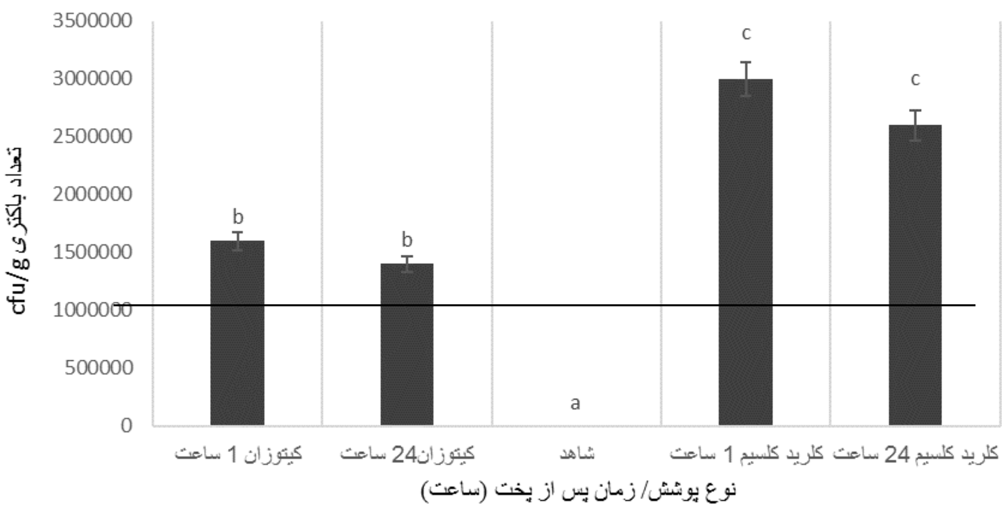


شکل 5- بررسی اثرات ریزپوشانی با کیتوزان 1 درصد و کلریدکلسیم 5 درصد بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪)، 1 و 24 ساعت پس از پخت نان
(اعداد نمودار بیانگر میانگین سه تکرار آزمایش هستند و حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 05/ می‌باشد)

بررسی اثرات ریزپوشانی با کیتوزان 1 درصد و کلریدکلسیم 5 درصد برتعداد باکتری (CFU/g) به مدت 1 و 24 ساعت پس از پخت نان

تعداد باکتری‌ها، در نمونه‌های ریزپوشانی شده با کلریدکلسیم 5 درصد (وزنی/ حجمی) به‌طور معنی‌داری، 1 و 24 ساعت پس از پخت، نسبت به کیتوزان اختلاف معنی‌داری نشان داد (شکل6). خط افقی بکاررفته در شکل نشان‌دهنده تعداد، 10^6 (CFU/g) باکتری پس از پخت نان است که معیار شاخص در تعریف فرآورده‌های پروبیوتیک می‌باشد. در هر دو پوشش 1 و 24 ساعت پس از پخت بیشتر از، 10^6 (CFU/g) باکتری زنده باقی مانده‌اند. با توجه به تعریف فرآورده‌های غذایی سین‌بیوتیک (حضور بالاتر از 10^6 باکتری زنده در هرگرم ماده غذایی به‌همراه ترکیبات پری‌بیوتیک (حضور ترکیبات قندی سوربیتول و مالتودکسترین در مرکز هسته)، این دو فرآورده سین‌بیوتیک هستند. تولید نان‌های پروبیوتیک به علت دمای بالایی که در زمان پخت بر

باکتری‌های حساس به حرارت وارد می‌شود هنوز گسترش نیافته است. در برخی تحقیقات، باکتری‌های ریزپوشانی‌شده به‌صورت فیلمی نازک بر روی سطح نان در اواخر دوره پخت، اضافه شد (فورتول و ترازاس (2012)، سوکولیس و همکاران (2014)). در تحقیق حاضر میزان زنده‌مانی نسبی باکتری‌های ریزپوشانی شده با محلول کلریدکلسیم 1 ساعت پس از پخت و 24 ساعت پس از آن به‌طور معنی‌داری نسبت به محلول کیتوزان افزایش یافت. میزان زنده‌مانی باکتری‌های ریزپوشانی شده با محلول کلرید کلسیم، 1 ساعت پس از پخت و 24 ساعت پس از آن به‌ترتیب (0/56و 0/52 درصد) و برای پوشش کیتوزان (0/4 و 0/36 درصد) نسبت به زنده‌مانی باکتری در محلول پروبیوتیک اولیه بود. برخلاف نتایج بدست‌آمده توسط سوکولیس و همکاران (2014) و فورتول و ترازاس (2012)، کاهش معنی‌داری در میزان زنده‌مانی باکتری 1 ساعت پس از پخت و 24 ساعت پس از آن، در دو پوشش به‌کار رفته مشاهده نشد. در تحقیق حاضر میکروکپسول‌ها به‌صورت هسته و پوسته می‌باشند. باکتری‌ها در مرکز هسته قرار گرفته و کمتر تحت تاثیر تنش‌های خارجی و داخلی قرار می‌گیرند، باکتری‌های ریزپوشانی شده به‌صورت پودر به مرکز نان قبل از پخت افزوده شدند و علاوه بر سهولت مصرف، بر روی ویژگی‌های پوسته نان تاثیرگذار نبودند.



شکل 6- بررسی اثرات ریزپوشانی با کیتوزان 1 درصد و کلرید کلسیم 5 درصد برتعداد باکتری (CFU/g) 1 و 24 ساعت پس از پخت نان

(اعداد نمودار بیانگر میانگین سه تکرار آزمایش هستند و حروف مختلف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 می‌باشد)

نتیجه‌گیری

در این تحقیق از پوشش کیتوزان در غلظت‌های0/5، 1 و 1/5 درصد (وزنی/ حجمی)، کلریدکلسیم 5 درصد و صمغ عربی در غلظت‌های 1/5، 3 و 6 درصد (وزنی/ حجمی) برای ریزپوشانی لایه دوم لاکتوباسیلوس روتری به مدت 90 دقیقه با استفاده از روش بسترشناور، استفاده شد. آزمون حرارتی در دمای 80 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 و 30 دقیقه انجام شد. میزان زنده‌مانی باکتری در ریزپوشانی با کیتوزان، صمغ عربی و کلرید کلسیم با غلظت‌های به ترتیب 1، 6 و 5 درصد (وزنی/ حجمی)، در آزمون حرارتی به مدت زمان 15 دقیقه به‌ترتیب (7/31 و 3/7 و9 درصد) بود که افزایش معنی‌داری نسبت به دیگر غلظت‌های مورد آزمایش مشاهده شد. میزان زنده‌مانی نسبی باکتری‌های ریزپوشانی شده با کلریدکلسیم 5 درصد (وزنی/ حجمی) پس از آزمون حرارتی در دمای 80 درجه سانتی‌گراد و زمان 15 دقیقه، 9 درصد بود که افزایش معنی‌داری نشان داد. تاثیر زمان پوشش‌دهی (45 و90 دقیقه) با محلول کلریدکلسیم 5 درصد و کیتوزان و صمغ عربی در غلظت‌های به‌ترتیب 1 و 6 درصد (وزنی/ حجمی)، بر زنده‌مانی نسبی باکتری (٪) پس از آزمون مقاومت حرارتی در دمای 80 درجه سانتی‌گراد و زمان‌های 15و30 دقیقه بررسی شد. زنده‌مانی باکتری، در پودر پوشش‌دهی شده به مدت 90 دقیقه، با محلول کلریدکلسیم با غلظت 5 درصد (وزنی/ حجمی) در دمای 80 درجه سانتی‌گراد و زمان 15 دقیقه، 9 درصد نسبت به غلظت باکتری‌های زنده (CFU/ml) در محلول اولیه بود و به طور معنی‌داری نسبت به پوشش‌های دیگر افزایش نشان داد. نتایج بررسی نشان داد که با افزایش زمان پوشش‌دهی، قطر میکروکپسول افزایش و میزان انتقال حرارت به قسمت مرکز هسته کاهش پیدا کرده و زنده‌مانی باکتری افزایش می‌یابد. میزان زنده‌مانی باکتری ریزپوشانی شده با کلریدکلسیم با غلظت 5 درصد (وزنی/ حجمی)، 1 و 24 ساعت پس از پخت در نان به ترتیب (0/56 و 0/52 درصد) بود

که به‌طور معنی داری نسبت به نمونه ریزپوشانی شده بـا کیتـوزان 1 درصد افزایش نشان داد. در هـر دو پوشـش 1 و 24 سـاعت پـس از پخت بیشتر از 10^6 (CFU/g) باکتری زنده باقی ماندند. تحقیق حاضر روشی را برای تهیه میکروکپسول‌های پوسته و هسته شامل بـاکتری پروبیوتیک لاکتوباسـیلوس‌روتـری (جـذب شـده بـر روی هسـته) و پوشش‌دهی شده دو لایه با آلژینات سدیم 1 درصد (وزنی/ حجمی) در لایه اول و کیتوزان 1 درصد (وزنی/ حجمی) یا کلرید کلسیم 5 درصد (وزنی/حجمی) در لایه دوم برای تهیه نان سین بیوتیک ارائه می‌دهد که باکتری‌های ریزپوشانی‌شده، تمامی مراحل پخت در نـان را طـی کرده و نیازی به تزریق باکتری‌های زنده پس از پخت نمی‌باشـد. بـا توجه به تعریف فرآورده‌های غذایی سین‌بیوتیک، (حضور بالاتر از 10^6 باکتری زنده در هرگرم ماده‌غذایی به‌همراه ترکیبات پری‌بیوتیک)، این دو فـرآورده بـا توجـه بـه حضـور ترکیبـات قنـدی سـوربیتول و مالتودکسترین در مرکز هسته، سین‌بیوتیـک هسـتند. نتـایج تحقیـق نشان داد که میکروکپسول‌های تشکیل شده به‌صورت هسته (محلول قند و باکتری جذب شده بر روی میکروکریسـتالین سـلولز) و پوسـته (پوشش‌های بررسی شده) به علت قرارگرفتن باکتری در مرکز هسته، کمتر تحت تاثیر تنش‌های بیرونی (دماهای بالا و pHهای پـایین) و داخلی (فشار اسمزی، تغییرات رطوبت و عوامل به وجود آورنده بیاتی) قرار می‌گیرند و باکتری‌های ریزپوشانی شده را به‌صورت پودر می‌توان به مرکز نان قبل از پخت افزود که علاوه بر سهولت مصرف، بر روی ویژگی‌های پوسته نان تاثیر نامطلوب نمی‌گذارند.

منابع

زاغری، ل. ، بصیری، ع.، رحیمی، س. و زنوزی، ع. بکارگیری لاکتوباسیلوس‌روتری در تهیه نان پروبیوتیک بخش 1: ارزیابی فرآیند ریزپوشانی به روش بسترشناور بر زنده‌مانی لاکتوباسیلوس‌روتری در شرایط شبیه‌سازی شده معده. پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران. در دست چاپ.

گنجوری، م .، محرابیان، ص.و اخوان سپهی ، ع .، 1391، غنی‌سازی نان‌های حجیم با باسیلوس های بالقوه پروبیوتیک (*باسیلوس کواگولانس*). مجله زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس، دوره 3، شماره 1، صفحه 38

Anal, K.& Singh, H., 2007, Recent advances in microencapsulation of probiotics for Industrial applications and targeted delivery. Trends in Food Science & Technology, 18: 240-251.

Behzadi, S., Shengqian, W., Toe gel, S., Hofrichter, M., Altenburger, I., Unger, F., Wirth, M.& Viernstein, M., 2013, Impact of heat treatment and spray drying on cellular properties and culturability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12. *Food Research International* ,54: 93–101.

Burgain, C., Gaiani, M., Linder, J.& Scher, M., 2011, Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial Applications. *Journal of Food Engineering*. 104: 467–483.

Capela, P., 2006, Use of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation of bacterial cells in improving the viability of probiotic organisms in freeze-dried yoghurt. in School of Molecular Science. Victoria (Australia) University, 158.

Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P.& Jones, M., 2004, An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp* in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*. 56: 27-35.

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibanez, F.C., Marzo, F.& Villaran, M.C., 2010, Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142: 185–199.

Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D.& Khutoryanskiy, V., 2011, Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *Biomacromolecules*, 12: 2834-2840.

Desai, K. G. H.& Park, H. J., 2005., Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23 (7): 1361-1394.

Desmond, C., Ross, E., O'Callaghan, G.& Fitzgerald, C., 2002, Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *J. Appl. Microbiol*, 93: 1003–1011.

Ekbeck, J.& Hakanson, E., 2012, Termostable lactobacillus strains. Patent, US8137952.

Fareeza, b., Ismail, M., Siong Meng Lima, b., Rakesh, K., Mishra, c.& Kalavathy Ramasamya, b.,2015, Chitosan coated alginate–xanthan gum bead enhanced pH andthermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. *International Journal of Biological Macromolecules*,72: 1419–1428.

Fortoul, R.& Terrazas, A., 2012, Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, 29: 166-174.

Kearney, N., Meng, X.C., Stanton, C., Kelly, J., Fitzgerald, G. F.& Ross, R., 2009, Development of a spray dried probiotic yoghurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *International Dairy Journal*. 19(11): 684-689.

Lima, C., Kruger, M., Destro, M.& Landgraf, M., 2009, Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp bulgaricus and Streptococcus. Food Science and Technology, 42: 491-494.

Mandal, S., Puniya, A.K.& Singh., K.., 2006, Effect of alginate concentration on survival of microencapsulated

Lactobacillus casei. *Int Dairy* J, 16: 1190–1195.

Michael, T.& Vitaliy, V., 2010, Production and evaluation of alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 100:145-146.

Min Kyeong, Cha., Myung Jun, Chung., Jin Eung Kim, Kang Oh Lee. & Nam Joo Ha.,2011, Comparison of Dual Coated (Duolac™) and Uncoated Lactic Acid Bacteria from

Potential Probiotics. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 25:3, 2489-2493.

Mosilhey, S.H., 2003, Influence of Different Capsule Materials on the Physiological Properties of Microencapsulated *Lactobacillus Acidophilus* This work has been done at the Department of Food Technology. University of Bonn, Germany.

Phoem, N., Chanthachum, S.& oravuthikunchai, P., 2015, Preparation of Eleutherine americana-Alginate Complex Microcapsules and Application in *Bifidobacterium longum*. Nutrients. 7: 831-848.

Qi, x., Jn, Y.& Liu, H., 2011, Microencapsulation of lactobasillus brevis and preliminary evalution of their therapeutic effect on the diarrhaea of neonatal calf. *Journal of animal and veterinary advances*, 10(2): 151-156.

Rosell, C., 2007, Vitamin and mineral fortification of bread. Technology of functional cereal products. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.

Sabikhi, L., Babu, R., Thompkinson, D. K.& Kapila, S., 2010, Resistance of Microencapsulated *Lactobacillus acidophil* LA1 to Processing Treatments and Simulated Gut ConditionsFood. *Bioprocess Technol*, 3: 586–593.

Semyonov, D., Ramon, O., Kovacs, A., Friedlander, L.& Shimoni, E., 2014, Air-Suspension Fluidized-Bed Microencapsulation of Probiotics. Drying Technology: *An International Journal*. 30(16): 1918-1930.

Solanki, H., Dipak, D., Dushyant, A., Vipul, D., Girish, K. & Akil, M., 2013, Development of Microencapsulation Delivery System for Long-Term Preservation of Probiotics as Biotherapeutics Agent. BioMed *Research International*, 620719, 21.

Soukoulis, C., Yonkers, L., Gann, H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C.& Fisk, I., 2014, Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: The case of pan bread. *Food Hydrocolloids*, 39: 231-242

Talebzadeh, S., Sharifan, A., Ghiassi Tarzi, B.& Ezzat panah, H., 2014, Assessment the possibility of probiotic jelly production using microencapsulation technique of *Lactobacillus acidophilus* bacteria. *International Journal of Biosciences*. IJB, 5(1): 143-154.

Zhou, Y., 1988, Spectrophotometric quantification of lactic bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 342-348.

Zorea, Y.& penhasi, A., 2012, Heat resistant probiotic compositions and healthy food comprising them. EP, 2451300 A1.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 1, Apr. May. 2018, p. 93- 106

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 1، فروردین-اردیبهشت 1397 ص. 106-93

Developing probiotic bread using *Lactobacillus reuteri* part 2: Evaluation of fluidized bed double microencapsulation on thermal stability of *Lactobacillus reuteri*

L. Zaghari[1], A. R. Bassiri[2*], S. Rahimi[2], A. Zonusi[3]

Received: 2016.06.19
Accepted: 2017.05.01

Intoduction: Probiotic products have been used worldwide in the last decades. They are significantly gaining popularity and their consumption is associated with increasing levels of health-consciousness. Probiotics can be defined as microbial cells that have a beneficial effect on the health and wellbeing of the host. In this sense different probiotic products have appeared on the market with different formulations and applications. Bread is the major type of bakery products and a staple food in most part of the world. Despite attempts to develop functional breads containing viable microorganisms, this has not been fully developed yet because of the high temperature during baking process. Viability of probiotic bacteria in the product at the point of consumption is an important consideration for their efficacy, as they have to survive during the processing and shelf life of food. *Lactobacillus reuteri* which naturally occurs in the human intestine possess probiotic properties with good colonization potential. The main purpose of probiotic encapsulation is to protect cells against an unfavorable environment, include high processing temperatures and storage. The fluid bed encapsulation process consists of spraying a coating solution into a fluidized bed of solid particles. After several cycles of wetting–drying, a continuous film is formed. The main parameters affecting the process are flow-rate and pressure of the spraying liquid, composition and rheology of the coating solution, flow-rate and temperature of the fluidizing air. Double microencapsulation for probiotics by air-suspension fluidized-bed coating is a good alternative method to achieve greater resistance to high temperatures during bread baking. The aim of this study was to evaluate the survival of *Lactobacillus reuteri* that had been double layered using chitosan, calcium chloride and Arabic gum for microencapsulation and which had been exposed to bread baking conditions.

Materials and Methods: Pure freeze-dried *Lactobacillus reuteri* PT-1655 were obtained from Persian Type Culture Collection (Tehran, Iran) and were activated by inoculation in the MRS broth at 37°C for 36-48 h. The air-suspension process was performed in a Wurster coater system with a bottom spraying atomizer. In various pretests, the fluidization pressure, the atomization pressure and the spraying rate of the microencapsulation process were varied to examine their influence on process conditions, especially on the particle development. In this study, chitosan, calcium chloride and Arabic gum at concentrations (0.5, 1 and 1.5% w/v), 5% w/v and (1.5, 3 and 6% w/v) were used as second layer in double microencapsulation, respectively. Heat resistance of unencapsulated and double encapsulated microorganisms was determined by placing in an oven which was preheated to 80°C for 15 and 30 minutes. The prepared dough after adding of unencapsulated and double encapsulated bacteria was shaped into loaves of 50 g each, placed in aluminum pans, and baked in a preheated oven at 180°C for 20 min and 70 – 80% relative humidity and then cooled at room temperature. The temperature during baking process was checked by putting a thermocouple at the crumb center. The viability of bacteria at controlled conditions was measured after 1 and 24 h after baking process. Experimental data have been represented as the mean with standard deviation (SD) of different independent determinations. The significance of differences was evaluated by analysis of variance (ANOVA). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and Discussion: The Survival of encapsulated bacteria with chitosan and arabic gum at

1. Former M.Sc. Student of Food Science and Technology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Food Technology and processing Faculty, Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Biosystems Engineering Faculty, Department of Agricultural research, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran
(*- Corresponding Author Email: bassiri@irost.ir)

concentration of 1% and 6% w/v after heat treatment (80°C for 15 min) was 7.31% and 3.7% and after heat treatment (80°C for 30 min) was 0.63% and 0.31% respectively and was significantly higher in comparison to other samples and control. Study of effect of coating time (45 and 90 min) on cell viability (%) after heat treatment (80°C for 30 min) showed that encapsulated bacteria with 5% w/v calcium chloride for 90 min after heat treatment (80°C for 30 min) was 9% and was significantly higher compared to other samples. Longer coating time led to an increase of microcapsule diameter which results in lower heat transfer to the core and increased cell viability. Cell viability of encapsulated bacteria with 5% w/v calcium chloride in baked bread after 1 and 24h storage was 0.56% and 0.52% respectively and was significantly higher compared to sample encapsulated with 1% w/v chitosan 0.47% and 0.44% respectively. The final counts of viable cells in both samples after 1 and 24 h storage were higher than 10^6 CFU/g.

Keywords: *Lactobacillus reuteri*, doublemicroencapsulation, fluidized bed coater, thermal stability, probiotic bread.